EXPERIMENTELLE PROTEOLYSE DER LUNGE UND DES RESPIRATIONSTRAKTS DURCH LEUKOZYTENPROTEASEN UND PAPAIN IN VIVO

WALTER BAUEREGGER

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 201 47 74

Aus der Klinik und Poliklinik
für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H.H. Naumann
Biochem.Labor: Leiter Prof. Dr. K. Hochstraßer

EXPERIMENTELLE PROTEOLYSE DER LUNGE UND DES RESPIRATIONSTRAKTS DURCH LEUKOZYTENPROTEASEN UND PAPAIN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Walter Baueregger
aus
Viechtach

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K.Hochstraßer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.H. Naumann
Dekan: Prof. Dr. med. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Theoretischer Teil	3
	I. Leukozyten	3
	1. Phagozytose	3
	2. Die pathologische Funktion der Leukozyten	4
	II. Lysosomen	5
	III. Proteasen	8
	1. Extrazelluläre Proteasen	8
	2. Pflanzliche Protease: Papain	8
	3. Leukozytenproteasen	9
	a) Kollagenase	10
	b) Elastase	11
	c) Kathepsin G oder Granulozyten--Chymotrypsin	12
	IV. Inhibitoren	13
	1. Die physiologische Funktion der Inhibitoren	13
	2. Die Inhibitoren bei pathophysiologischen Bedingungen	14
C	Ergebnisse	17
D	Diskussion	23
E	Experimenteller Teil	25
	I. Gewinnung der Leukozytenproteasen	25
	1. Gewinnung der Leukozyten	
	2. Proteasenkonzentrierung	25
	II. Die Inaktivierung der Leukozytenproteasen	27
	III. Papain	
	1. Proteolytische Aktivität im p_H-Bereich von 7,8	27
	2. Die Inaktivierung von Papain	27
	IV. Die Proteasen im Tierversuch	28
	1. Konzentration	28
	2. Die Applikation der Proteasen	31

		Seite
	V. Herstellung der Präparate	32
F	Zusammenfassung	33
G	Literaturverzeichnis	34

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

PMN = polymorphkernige neutrophile Leukozyten

Cyclo AMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

Cyclo GMP = cyclisches Guanosinmonophosphat

BSI = Bronchialsekretinhibitor

ITI = Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0046

A Einleitung

Von der jahrtausendalten Lehrweisheit des lobenswerten Eiters bei der Wundheilung und des bösartigen Eiters, der von Brand, Rotlauf und Tod gefolgt war, ist in der heutigen differenzierten Medizin nicht mehr viel übrig geblieben.
Fest steht jedoch, daß Eiter ein Glied in der Kette der Entzündung beziehungsweise der humoralen Infektionsabwehr ist. Leukozyten zerfallen bei massiven Infekten und setzen Proteasen frei, die zu Gewebszerstörung und Abszedierung führen. Die Serum-Inhibitoren alpha$_1$-Antitrypsin, alpha$_2$-Makroglobulin und alpha$_1$-Chymotrypsin hemmen die proteolytische Wirkung der freigesetzten PMN-Enzyme und grenzen deren Wirkungsraum ein. Bei Patienten mit hereditärem Mangel an alpha$_1$-Antitrypsin beschrieben Laurell und Eriksson (28) ein vermehrtes Auftreten von Lungenemphysemen und führten die Atrophie der Interalveolarsepten und Verödung der Lungenkapillaren auf die zerstörende Wirkung leukozytärer Proteasen zurück.
Auch eine Gefäß-Endothel-Schädigung sowohl lokalisierter wie auch generalisierter Art beim Arthus-Phänomen scheint erwiesen. Und zwar findet nach Komplement-Aktivierung durch Antigen--Antikörper-Komplexe eine chemotaktische Leukozytenemigration statt, deren Lyse nach Antigen-Antikörper-Komplex-Phagozytose wiederum Proteasen freisetzen.
Ein weiterer Arbeitskreis um Oronsky (41) weist Knorpeldestruktion durch leukozytäre Proteasen im Synovialspalt der Gelenke nach. Hier ist es vor allem Kollagenase, die in rheumatischen Gelenken Knorpelproteoglycan verdaut und zur rheumatischen Arthritis führt. Dieser Arbeitskreis erbrachte auch den Nachweis, daß Leukozyten schon bei der Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen Proteasen nach extrazellulär freisetzen, ohne dabei selbst der Lysis zu unterliegen.
Der Arbeitskreis um Janoff (27) beschreibt eine vaskuläre Basalmembranschädigung durch PMN-Proteasen, vor allem durch Elastase und sieht darin einen Teil der Aethiologie der Vaskulitis und der akuten Arteritis.

Im oberen Respirationstrakt ist zusätzlich ein spezielles Hemmprotein isoliert worden (14,15), das Leukozytenenzyme hemmt wie alpha$_1$-Antitrypsin. Dieser lokale Inhibitor wird vom Flimmerepithel sezerniert. Immunologisch wurde nachgewiesen, daß tatsächlich nicht nur Komplexe zwischen Leukozytenproteasen und alpha$_1$-Antitrypsin, sondern auch analoge komplexe mit dem Bronchialsekret-Inhibitor auftreten. Da in pathologisch veränderten Sekreten des Respirationstrakts hohe proteolytische Aktivitäten nachweisbar werden, ist dies ein Hinweis, daß das Bronchialsekret-Inhibitor-System erschöpfbar ist, wie dies bei massiven Infekten mit Leukozytenemigration oder der Ozaena der Fall sein mag.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in Abhängigkeit von Einwirkungszeit und Konzentration leukozytärer Proteasen Destruktionen bei physiologischem Inhibitorspiegel an Lunge und Respirationstrakt von Kaninchen experimentell zu erzeugen sind. Der Nachweis soll histologisch erfolgen. Aus reproduzierbaren Gewebsveränderungen könnten eventuell Rückschlüsse auf Art und Menge eines therapeutisch etwa zu substituierenden Inhibitors gezogen werden.

B Theoretischer Teil

I. Leukozyten

In der Regel zählt man in der Zählkammer unter dem Mikroskop 4000 bis 8000 Leukozyten pro mm^3 Blut beim gesunden Individuum. Diese Zahl stellt aber quasi nur die Spitze eines Eisbergs dar, denn die Verweildauer eines Leukozyten im Blut beträgt nur circa 10 Stunden, dann verläßt er das Gefäß und so finden sich 57% der Leukozyten des menschlichen Körpers im Gewebe, 38% sind in Neubildung im Knochenmark begriffen und nur 5% finden sich im Blut. Die Lebensdauer eines Leukozyten beträgt nur etwa 10 Tage, davon entfallen 4-5 Tage auf die Neubildung, circa 10 Stunden auf die Verweildauer im Blut, und circa 4-5 Tage im Gewebe. Dann folgt die Autolyse.
Morphologisch werden die Leukozyten unterschieden in neutrophile polymorphkernige, basophile und eosinophile Granulozyten je nach Farbaffinität ihrer intracytoplasmatischen Granula. Weiterhin zählen auch die Monozyten oder Makrophagen zu den Leukozyten, die durch einen gebeugten, nicht segmentierten Kern und durch ihre auffallende Größe gekennzeichnet sind.
Lymphozyten sind an ihrem den Zellkörper fast vollständig ausfüllenden Kern zu erkennen. Sie entstehen im Thymus und im Knochenmark. Plasmazellen sind durch ihre Größe und den auffallenden radspeichenartig geformten Kern mit juxtanucleärem Hof charakterisiert.

1. Phagocytose

Nach etwa zehnstündiger Präsenz der Leukozyten im zirkulierenden Blut treten die amoeboid beweglichen Leukozyten aktiv durch die Gefäßwand ins Interstitium, besonders in der Haut und im Intestinaltrakt. Ihre physiologische Aufgabe besteht nun darin, Zelltrümmer, eingedrungene Bakterien, Antigen-Antikörper--Komplexe, Schmutzpartikel und Urat-Kristalle abzuräumen. Besonders als Teil der in der Regel schematisch ablaufenden

Entzündungsreaktionen spielen die Leukozyten eine wichtige physiologische Funktion. Mit der reaktiven Hyperämie, bedingt durch die Weitstellung der Kapillaren, werden bis zum Zehnfachen der Blutmenge an den Ort der Gewebsalteration herangeführt. Die Leukozyten bleiben am Gefäß-Endothel haften. Diesen Vorgang bezeichnet man als Margination.
Bei der Phagocytose werden die abzubauenden "Kleinteile" von den Granulocyten inkorporiert. Dabei bildet der Granulocyt Pseudopodien aus, stülpt diese um das Bakterium und schnürt ins Zellinnere hinein das Phagosom ab, das noch von Plasmalemm-Membran umgeben ist. Im Zellinnern verschmilzt das Phagosom mit einem Lysosom um Phagolysosom beziehungsweise zum sekundären Lysosom. Die Hydrolasen des Lysosome vermögen nun das eingeschlossene Bakterium zu verdauen.
Die Phagocytose wird von mehreren Faktoren beeinflußt. Opsonine des Serums fördern die Phagocytose. Das sind thermostabile, spezifische Antikörper (Immunopsonine), die für bestimmte Mikroorganismen spezifisch sind. Auch unspezifische, thermolabile Opsonine, die nur in Gegenwart von Komplement reagieren und der $alpha_1$-beta-Globulin-Fraktion angehören, steigern die Phagocytosefähigkeit.
Beide Arten der Opsonine verändern die Bakterienoberfläche in Richtung Klebrigkeit, so daß sie leichter phagocytiert werden können.
Aber auch Calziumionen, basische Proteine und Fibrinfäden fördern die Phagocytose durch Veränderung der bakteriellen Oberflächenladung.
Eine Beeinträchtigung der Phagocytose erfolgt durch Vitamin- oder Proteinmangelzustände, Jodazetat, Natriumfluorid oder Influenza-Viren.

2. Die pathologische Funktion der Leukozyten

Nach klassischer Auffassung (Metchnikoff 1887) können nun diese Proteasen aus den Lysosomen primärer oder sekundärer

Art beim Tod des kurzlebigen PMN frei werden und ins Interstitium gelangen. Dies trifft sicher für Natrium-Urat-Kristalle oder Bakterien zu, die leukotaktische Enzyme beherbergen wie einige pyogene Mikroorganismen. Bakterientoxine und leukozytäre Enzyme bewirken eine rasche Auflösung der Gewebselemente und beschleunigen die durch die Enzyme der untergehenden Zellen ausgelöste Autolyse.
Die Auflösung des nekrotischen Gewebes und des Fibrins durch die PMN-Enzyme, die nach dem Absterben frei werden, stellt eine äußerst wichtige Phase der Entzündung dar.
Der weitere Abbau des Exsudats samt zugrundegegangener PMN erfolgt durch Monozyten. Nach Abräumen des Exsudats und des nekrotischen Gewebes beginnen reparative Vorgänge.
Die frei werdenden lysosomalen Enzyme können aber auch bestehende und erhaltene Gewebe zerstören. Bei Entzündungen in großen Körperhöhlen und bei der normal verlaufenden Pneumonie wird viel Exsudat freigesetzt, das viel Inhibitoren enthält und das benachbarte Gewebe bleibt intakt. In festen Geweben wird wenig Exsudat gebildet und es entsteht ein Abszeß.

II. Lysosomen

De Duve (3) entdeckte und charakterisierte als Erster die Lysosomen und deren Rolle bei der intrazellulären Verdauung auto- und heterologen Materials. Ein Ausströmen (leakage) lysosomaler Enzyme in den interzellulären Raum wird auf eine labilisierte Lysosomen-Membran zurückgeführt. Auch Regurgigation oder aktive Extrusion der lysosomalen Enzyme wird diskutiert.
Die extrazelluläre Verdauung von Bindegewebe fanden Weissmann und Dingle (52). Ihre Hauptentdeckung war, daß eine Lysosomen--Disruption oder Lysosomenlabilität bei Vitamin-A-Mangel zu Knorpel-Matrix-Schädigung führte, weil die Lysosomen proteolytische Fermente enthalten, die den Grenzen der lysosomalen Membran entkamen.

Movat (32) zeigte, daß Immun-Komplexe von PMN phagozytiert werden, die dann mit den Primärlysosomen verschmelzen, um anschließend zu den instabileren Sekundärlysosomen zu werden. Diese Serie von Ereignissen wird gefolgt von Ausschüttung lysosomalen Inhalts in die extrazelluläre Umgebung.
Wieder neuere Untersuchungen von Wright (53) und Ignarro (17) haben ergeben, daß diese Freisetzung des Lysosomen-Granula--Inhalts selektiv erfolgt, das heißt ohne begleitende Freisetzung wesentlicher cytoplasmatischer Bestandteile der phagozytierenden Zellen. Wright versuchte daraufhin, mit verschiedenen Agentien Einfluß auf die Labilität der Lysosomenmembran zu nehmen, und fand heraus, daß Colchizin und Corticoide, aber nicht Salicylat, isolierte Lysosomen stabilisieren beziehungsweise in vivo die Degranulation hemmen.
Ignarro (17) fand noch weitere Faktoren, die die lysosomale Enzymsekretion erhöhen: Immunreaktanten, Azetylcholin, Prostaglandin und Calzium-Ionen. Weiterhin entdeckte er einen Zusammenhang zwischen Anhäufung von Cyclo-AMP in den PMN bei Hemmung der Enzymfreisetzung aus den Lysosomen. Er glaubt sogar, daß die Anwesenheit von Cyclo-AMP und Cyclo-GMP und die zellulären Prozesse diese Nukleotide jeweils anzuhäufen den PMN die Möglichkeit geben, auf verschiedene endogene Substanzen und Drogen mit gesteuerter Enzymfreisetzung zu antworten.
In seiner Arbeit über die hormonelle Kontrolle der lysosomalen Enzymfreisetzung aus PMN (20) und in weiteren Veröffentlichungen scheint auch eine nichtphagozytotische Freisetzung lysosomalen Inhalts nachgewiesen (18,19). Nicht phagozytierbare, hitzeverklumpte, immobilisierte IGg erhöhten die lysosomale Fermentausscheidung.
Eine Steuerung dieser nicht phagozytotischen Freisetzung über Epinephrin, Azetylcholin und Atropin mit begleitendem Cyclo-GMP und Cyclo-AMP-Wechselwirkungen, die wie Neurotransmitter funktionieren, scheint durch das autonome Nervensystem gegeben zu sein.

Andererseits berichtet Ignarro (17) von in vivo-Versuchen, die zeigen, daß Hydrocortison, Paramethason, Phenylbutazon, Indomethazin und Aspirin die Freisetzung aus den Lysosomen hemmen. Er kommt zu der Erklärung, daß die meisten anti-inflammatorischen Pharmaka ihren klinischen Effekt auf die Stabilisierung der Lysosomenmembran zurückführen.
Neuere Arbeiten von Baggiolini, Bretz und Dewald (1, 2, 3, 4, 7, 33) beschreiben die PMN-Granula und deren Inhalt in struktureller und biochemischer Sicht.
Man unterscheidet azurophile und spezifische Granula. Baggiolini und seine Mitarbeiter charakterisieren die azurophilen Granula als primäre- oder Superlysosomen, die sowohl Granulaprotein, bakterizide Agentien als auch saure und neutrale Hydrolasen enthalten. Im Gegensatz dazu fehlen den spezifischen Granula die sauren Hydrolasen und sie enthalten nur einen etwa hälftigen Anteil am Gesamtlysozym der Zelle, dazu Lactoferrin und eine Kollagenase. Da die sauren Hydrolasen in den spezifischen Granula als Charakteristikum fehlen, können sie nicht als typische Lysosomen betrachtet werden. Vielmehr konnte nur berichtet werden, daß die spezifischen Granula in den Myelozyten gebildet werden und als Zisternen des EPR und Golgi-Apparats aufzufassen sind und allgemein ihren Inhalt bereitwilliger in die Vakuolen entleeren als die azurophilen Granula.
Interessant zu erwähnen ist weiterhin, daß noch 1965 die sauren Hydrolasen als primäre Mediatoren der Gewebsschädigung bei der Entzündung vorgeschlagen wurden. Neben dem potentiellen Angriff auf Gewebsziele wurde auch eine Gewebsschädigung durch Freisetzung von Kinin diskutiert.
Cochrane (6) schlug vor, daß erniedrigter Gewebs-p_H, resultierend aus der Laktatproduktion der PMN, eine obligate Bedingung für die saure Katepsin-Aktivität sei oder daß die hohe H^+-Konzentration bei p_H-Werten von 2,5 bis 3,5 ausreichend sei, die Zellwände zu schädigen.

Erst durch die Entdeckung neutraler Proteasen wurden all diese Diskussionen beendet und den sauren Kathepsinen ihre Rolle bei der intrazellulären Verdauung von phagozytiertem Protein in der Vakuole zugewiesen.

III. Proteasen

1. Extrazelluläre Proteasen

Allgemein sind Proteasen als extrazelluläre Verdauungsenzyme des Magen-Darm-Trakts bekannt. Sie katalysieren die Spaltung der Peptidbindung, sind also C-N-Hydrolasen. Die Hauptvertreter der extrazellulären Proteasen sind Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin, wobei Pepsinogen als inaktive Vorstufe des Pepsins in der Magenschleimhaut gebildet und in das Lumen des Magens sezerniert wird. Erst dann geht Pepsinogen im p_H-Bereich von 1 bis 2 durch Abspaltung mehrerer Peptide in das aktive Enzym über. Gleichzeitig wirkt eines der abgespaltenen Peptide im neutralen Bereich als Pepsin-Inhibitor. Im sauren Milieu ist der Inhibitorkomplex dissoziiert und wird vom Pepsin gespalten.
Trypsin wird als Trypsinogen, Chymotrypsin als Chymotrypsinogen in den Pankreaszellen gebildet. Beide Vorstufen sind proteolytisch inaktiv und werden erst im Darm bei alkalischen p_H-Werten von 7,5 bis 8,5 autokatalytisch in Gegenwart von Trypsin zu proteolytischen Enzymen aktiviert.
Weiterhin unterscheidet man die Proteasen ihrer Funktion nach in Endo- und Exopeptidasen.
Während die Endopeptidasen die Proteine in der Mitte der Kette spalten wie Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin und die Kathepsine, greifen die Exopeptidasen vom Karboxyl- oder Aminoende der Kette her an. Sie wirken vor allem auf kleine Bruchstücke wie Oligo- und Polypeptide ein. Sie kommen sinnvollerweise erst im Dünndarm bei alkalischem p_H vor..

2. Pflanzliche Protease: Papain

Papain ist eine pflanzliche Protease aus den Früchten des Papayabaums. Als reines Enzym besitzt es ein Molekulargewicht

von 21 000, in Spezifität des Angriffsorts ähnelt es dem Pepsin und Chymotrypsin. Im aktiven Zentrum des Enzyms ist eine HS-Gruppe, die wahrscheinlich im Verlauf der Katalyse acyliert und deacyliert wird (analog zum Serinrest des Trypsin und Chymotrypsin).
Papain spaltet auch manche Ester und Amide. Sein p_H-Optimum liegt im neutralen Bereich.

3. Leukozytenproteasen

Ignarro gibt in seiner Veröffentlichung (17) einen kurzen geschichtlichen Abriß über die Entdeckung der Leukozytenproteasen: Phemister fand 1924, daß nur staphylokokkenhaltiger Eiter, aber nicht tuberkulöser Eiter die matrix artikulären Knorpels verdaute. Er zog schon damals den Schluß, daß die Dominanz der Leukozyten im Gegensatz zur Mehrheit der Lymphozyten im tuberkulösen Eiter die Ursache sein müsse.
Diese frühen Beobachtungen wurden 1960 von Ziff bestätigt, der keine neutralen Proteasen in Lymphozyten aber wohl in PMN fand.
Erst 1975 finden Lazarus und Grayzel (9) eine Oberflächenprotease bei Lymphozyten mit breitem p_H-Bereich.
Die Existenz neutraler Proteasen in Leukozyten wurde dann erstmals von Opie 1927 und von Grob 1949 (11) bestätigt.
Schon 1946 war Grob (10) die Hemmung der Proteasen-Aktiviät durch Serum bekannt.
Mounter (30) und Atiyeh (30) extrahieren 1959 aus PMN eine Protease mit einem p_H-Optimum von 8,0 und charakterisieren sie als chymotrypsinverwandt.
Schließlich publizieren 1968 Janoff und Zeligs (27) die in vitro-Gefäßschädigung der Basalmembran durch neutrale Proteasen aus PMN, wobei betont wird, daß eine deutliche Differenz dieser Proteasen zu bekannten Kathepsinen und trypsinähnlichen beziehungsweise pankreatischen Esterasen besteht.

a) Kollagenase

1968 isoliert und charakterisiert Lazarus (54) als erster eine Kollagenase aus Human-PMN-Granula, die Kollagenfibrillen verdaut und die Viskosität von Kollagenlösungen erniedrigt. Das Enzym beschreibt er als aktiv bei neutralem bis leicht alkalischem p_H und als nicht hemmbar durch Serum.
Er vermutete, daß der Kollagenabbau durch diese Kollagenase nur mit akuter Entzündung vergesellschaftet sei.
1973 veröffentlichten Ohlsson und Olsson (39) die Darstellung zweier elektrophoretischer Varianten einer Kollagenase, die sie aus PMN leukämischer Patienten isolierten. Diese beiden Enzyme spalteten hochspezifisch frisches Kollagen in zwei Fragmente, verdauten auch Fibrinogen und bis zu einem gewissen Grad Knorpelproteoglycan. Beide Enzyme werden von $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_2$-Makroglobulin gehemmt.
Ignarro konnte jedoch Proteoglycan-Abbau nicht beobachten.
1973 berichtete Oronsky (41) von einer Prokollagenase aus PMN, die in großen Mengen aus lebenden Zellen während der Phagozytose von verklumptem IGg freigesetzt wird. Dieses Proenzym wird durch Trypsin und durch rheumatische Synovialflüssigkeit aktiviert. Die Aktivierung geht durch eine limitierte Proteolyse des Proenzyms vor sich.
Janoff (21) bringt weitere Daten über die PMN-Kollagenase. Sie ist abhängig von bivalenten Kationen und durch Chelat-Agentien stark hemmbar, was jedoch erste Schwierigkeiten in der Diskussion aufwirft, da die Chelat-Eigenschaften angehäufter Mucopolysaccaride in der Knorpelmatrix die Enzymaktivität in situ unterdrücken müßten.
1977 veröffentlichen Bretz und Baggiolini (4) neuere Untersuchungen über die Lokalisation der Proteasen in den PMN und weisen sie ausschließlich in den spezifischen Granula nach. Dies steht im Widerspruch zu der Veröffentlichung von Ohlsson, Olsson und Spitznagel von 1977, die die Kollagenase und die Elastase in den azurophilen Granula lokalisierten. Baggiolini, Bretz und Dewald (4) führen in ihrer Versuchsbeschreibung den Vorteil der gleichzeitigen Inkubation mit selektiven Inhibitoren an, der präzisere Rückschlüsse erlaubt.

b) Elastase

1968 fanden Janoff und Scherer (23) in einer PMN-Granula--Fraktion elastolytische Aktivität. Die Eigenschaften der PMN-Elastase unterscheiden sich deutlich von der Pankreas--Elastase. Zum ersten ist die PMN-Elastase zehnmal widerstandsfähiger gegen Seruminhibitoren als die Pankreas-Elastase, und zum zweiten haben beide Enzyme ihr Wirkungsoptimum bei p_H 8,5. Jedoch besitzt die Leukozytenelastase bei p_H 7 noch circa 50% und die Pankreas-Elastase nur noch circa 10% ihrer Aktivität. Als pathologischer Effekt wird eine Elastolyse bei der akuten Arteritis vermutet, da Elastika aus Humanarterienwand in vitro abgebaut wird, wenn man Gewebe mit Leukozytenextrakten inkubiert.
1970 veröffentlicht Janoff (22) dann in vivo-Versuche mit dieser Elastase. Nach aortaler, intramuraler Injektion dieser elastolytischen Granulafraktion in lebende Hunde erfolgte der Verlust elastischer Fasern der Gefäßwände innerhalb zwei bis vier Stunden.
Außerdem fand er bei p_H 6 noch circa 50% der Aktivität und schloß, daß die Elastolyse durch dieses Enzym auch im akut entzündeten Gebiet bei erniedrigtem p_H fortschreiten kann. Diese Elastase ist auch an der Schädigung der Basalmembran während der PMN-bedingten Vaskulitis und am Zusammenbruch der elastischen Fasern während der akuten Arteritis beteiligt.
Die Darstellung dieser Elastase glang Janoff 1973 und Ohlsson 1974 (39), wobei Ohlsson und Olsson (39) wiederum PMN aus dem Blut leukämischer Patienten verwendeten. Sie isolierten drei elektrophoretische Varianten mit einem p_H-Optimum von 8,5. Die Molekulargewichte fanden sich zwischen 33 000 und 36 000. Die drei Elastasen werden durch $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_2$-Makroglobulin gehemmt. Auch aus dem PMN gesunder Individuen gelang es, diese drei Enzyme zu isolieren.
In den Veröffentlichungen (25,26,5) weisen Janoff und Blondin 1973 bis 1976 die Verdauung von bakteriellen Proteinen durch die PMN-Elastasen nach und vermuten hierin die physiologische Rolle dieses lysosomalen Enzyms, nachdem bisher eigentlich nur

pathologische Effekte während der Entzündung und bei rheumatischen Erkrankungen diskutiert wurden.
Janoff (21) bemerkt 1975 in seiner Übersicht, daß es ein Charakteristikum der spezifischen PMN-Granula sei, sowohl saure als auch neutrale Proteasen zu beherbergen, wozu im Gegensatz die klassischen Granula der Leber- und Nierenzellen ausschließlich saure Hydrolasen enthalten.
Weiterhin stellt Janoff fest, daß die PMN-Elastasen und das PMN-Kathepsin G Bindegewebskomponenten in Gelenken angreifen und durch Diisopropylfluorphosphat gehemmt werden und damit zur Klasse der serinabhängigen Proteasen zu zählen sind.
Baggiolini (4) berichtet 1977, daß die azurophilen PMN-Granula drei neutrale Proteasen enthalten und zwar Elastase, Kathepsin G (Granulozyten-Chymotrypsin) und eine dritte neutrale Protease. Er findet weiterhin zwei saure Proteasen: Kathepsin B (eine Thiol-Proteinase) und Kathepsin D (eine Karboxyl-Proteinase). Die Proteasen scheinen in multiplen aktiven Formen zu erscheinen, wie mit kationischer Plattenelektrophorese in Polyacrylamid--Gel nachgewiesen wurde. Hier erscheint die Elastase in drei oder vier Varianten und Kathepsin G erscheint in zwei Varianten (4). Während Ohlsson und Olsson 1973 (40) noch von verschiedenen Enzymen ausgehen, schreibt Janoff 1975 (21) dann nur noch von Varianten ein und derselben Protease.

c) Katepsin G oder Granulozyten-Chymotrypsin

Schon 1959 findet Mounter (30) eine Protease aus PMN, die chymotrypsinverwandt ist und durch Organophosphate gehemmt wird. 1974 gelingt Gerber und Carson (8) die teilweise Darstellung und Charakterisierung eines chymotrypsinähnlichen Enzyms aus Humanleukozyten, dessen Substratspezifität ähnlich dem Pankreas--Chymotrypsin ist. Das Molekulargewicht bestimmten sie etwa doppelt so hoch wie das von Pankreas-Chymotrypsin.
Rindler, Schmalzl und Braunsteiner (47) veröffentlichen 1974 weitere Daten über dieses Granulozyten-Chymotrypsin. Sie berichten über antibakterielle Wirkung und vaskuläre Permeabilitätserhöhung.

Sie isolieren (48) drei kationische Proteine, die streng von Elastase und Kollagenase unterschieden werden, da sie außer von $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_2$-Makroglobulin auch von Chamotrypsin-Inhibitoren gehemmt werden.
Janoff (21) spricht wiederum von drei Varianten, die elektrophoretisch zwar auftrennbar seien, jedoch nur als unterschiedliche aktive Formen ein und desselben Enzyms anzusehen sind. Er diskutiert auch die Möglichkeit, daß viele Proteasenformen Artefakte aus limitierter Selbstverdauung während der Isolationsprozedur sind.

IV. Inhibitoren

1. Die physiologische Funktion der Inhibitoren

Über die Hemmung der Leukozytenproteasen durch allgemeine und spezielle Inhibitoren waren nahezu alle Arbeitskreise befaßt, die sich mit den Leukozytenproteasen und deren Sinn und Schaden beschäftigten. Schon Grob (10) listete 1946 eine beträchtliche Reihe von Reduktionsmitteln, Sulfonamiden und Oxidationsmitteln auf, die die Aktivität der PMN-Proteasen hemmen. Erstmals weist er im Serum eine antiproteolytische Aktivität nach und nennt sie Serum-Antiprotease.
Erst später wird die alpha-Globulin-Fraktion und genauer das $alpha_1$-Antitrypsin, das etwa 90% des IG_A ausmacht, als Serum-inhibitor erkannt. Weiterhin finden sich noch $alpha_2$-Makroglobulin und $alpha_1$-Antichymotrypsin im Serum, die neben Pankreastrypsin, Chymotrypsin und Plasmin vor allem die leukozytären Proteasen Elastase, Kollagenase und Kathepsin G im Serum hemmen.
Diese Hemmung der PMN-Proteasen ist physiologischerweise in solchen Parenchymen besonders wichtig, die eine gewisse Leukozytenspeicherfunktion besitzen beziehungsweise in denen die Verweildauer und somit die Zerfallsrate der Leukozyten besonders hoch ist.

2. Die Inhibitoren bei pathophysiologischen Bedingungen

Unter pathophysiolcgischen Bedingungen finden Freisetzungen der Leukozytenproteasen zusätzlich dort statt, wo bei putriden Infektionen oder Abszedierungen Einschmelzungen des Gewebes Zeichen eines lokalen Überschusses leukozytärer Proteasen darstellen.
Die Hemmung der Proteasen erfolgt über Komplexbildung zwischen Inhibitor und Protease. Hierbei sind die molaren Bindungsrelationen nach Ohlsson und Olsson (37) für PMN-Elastase zu $alpha_1$-Antitrypsin wie 1 : 1 und für PMN-Elastase zu $alpha_2$--Makroglobulin wie 2 : 1. Zusätzlich ist die PMN-Elastase etwa zehnmal widerstandsfähiger gegen $alpha_1$-Antitrypsin als Trypsin.
In purulenten Sputen von Patienten mit purulenter Bronchitis fanden Ohlsson und Tegner (36) auch keine freien Inhibitoren wie $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_2$-Maktroglobulin mehr, sondern nur noch Komplexe, freie Elastase und freie Kollagenase.
Daraus folgt die Erschöpfbarkeit der Proteasenhemmkapazität bei massiver Proteasenfreisetzung.
Auch bei Patienten mit Peritonsillarabszessen, Angingen, Sinusitiden und Zustand post operationem wurden Seruminhibitor-proteasenkomplexe nachgewiesen (Hochgesand, Hochstraßer 13).
Laurell und Eriksson (28) beschreiben 1969 erstmals das gemeinsame Vorkommen von obstruktivem Lungenemphysem und $alpha_1$-Antitrypsinmangel.
1971 belegen Liebermann und Gawad (29) den Zusammenhang bei genetisch gedingtem $alpha_1$-Antitrypsinmangel und somit PMN--Proteasen-Inhibitormangel und pulmonalem Emphysem in vitro. Nachdem sie Leukozytenproteasen aus Blut extrahierten, und diese in vitro Lungengewebe abbauten, stellten sie das Postulat auf, daß ein ererbter Mangel an $alpha_1$-Antitrypsin zur Entwicklung eines pulmonalen Emphysems prädestiniert.
1977 gelingt Senior, Tegner und Ohlsson (49) die Induktion eines pulmonalen Emphysems in vivo, indem sie gereinigte PMN--Elastase in die Tracheen von 46 Hamstern spritzten: 13 Tiere starben innerhalb einer Woche an ausgedehnten Hämorrhagien.

Parallel durchgeführte intratracheale Applikation von Pankreas-Elastase induzierte weit geringere Hämorrhagien, jedoch nach zwei Monaten ein stärkeres Emphysem als die PMN-Elastase, was die Autoren auf den Schutzmechanismus des BSI zurückführten. Dieser wurde 1971 von Hochstraßer und Reichert (15) entdeckt. Der Inhibitor ist säurestabil und besitzt ein Molekulargewicht von nur 14 000. Er hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Pronase und Leukozytenprotease. Er wurde aus dem Sekret des Flimmerepithels isoliert und kommt im Serum nicht vor. Als Bildungsstätten wurden sowohl die Becherzellen des Flimmerepithels als auch die tubuloalveolären Drüsen in der tunica propria diskutiert (44). Ohlsson und Tegner (51) weisen 1977 durch eine spezielle indirekte Färbemethode die Produktionsstätte des BSI schließlich in zwei Strukturen nach. Sowohl in den hochprismatischen Zellen des Flimmerepithels als auch in den seromukösen Drüsen des darunterliegenden Propriabindegewebes war eine starke Färbung erkennbar. Die tunica propria selbst wies generell keine Färbung auf und auch die Becherzellen allein können nicht endgültig als Bildungsort des BSI angenommen werden, da die indirekte Färbung die oberen zwei Drittel des Flimmerepithels erfaßte und nicht etwa nur isoliert die Becherzellen.
Die Hemmkapazität des BSI im Nasen- und Bronchialsekret beträgt etwa 70%. Die restlichen 30% entfallen auf das $alpha_1$-Antitrypsin. Der BSI bildet mit den Proteasen Komplexe, wobei beispielsweise das Molaritätsverhältnis mit der chymotrypsinähnlichen Leukozytenprotease 1 : 1 beträgt (35). Die molare Bindungsrelation des BSI mit der PMN-Elastase verhält sich ebenfalls wie 1 : 1. Die PMN-Kollagenase wird nicht durch den BSI gehemmt, sondern ausschließlich durch $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_2$-Makroglobulin (38).
Bei akuten chronischen Infekten des Respirationstrakts ist der Spiegel an freiem BSI erniedrigt und es finden sich fast ausschließlich Komplexe. Bei frischen purulenten Infektionen des sinus maxillaris und bei der Ozaena ist der BSI-Spiegel null, und es können freie Proteasen nachgewiesen werden (46).

1973 isolieren Hochstraßer und Reichert (16) einen zweiten BSI mit einem Molekulargewicht von 20 000 aus Bronchialsekret. Der Inhibitor hemmt Trypsin, Chymotrypsin und Leukozytenproteasen. Anfangs wird vermutet, daß zumindest einer der beiden BSI eine echte Sekretionsleistung des Flimmerepithels ist, und der zweite Inhibitor auf Grund der Antigenverwandtschaft mit dem äußerst labilen ITI des Serums möglicherweise ein Derivat desselben darstellen könnte.
1976 gelingt der Nachweis (43), daß der ITI als Inhibitogen aufzufassen ist. Durch limitierte Proteolyse mittels Pankreaskallikrein kann der BSI aus ITI in vitro freigesetzt werden. Der hochmolekulare und nicht sezernierbare ITI ist demnach als Proinhibitor beziehungsweise als humoraler Proinhibitorpool für sezernierbare, niedermolekulare Inhibitoren aufzufassen. Der Abbau beziehungsweise die teilweise Proteolyse des ITI scheint lokal begrenzt in der Mucosa vor sich zu gehen. Die Zerlegung des ITI wird bei chronischen Infekten in geschädigter Mucosa auch nicht gestört (43).
Naumann berichtet 1978 in einem Vortrag (34), daß der eine der beiden BSI ein Kazal-Typ-Inhibitor ist, der nur in exkretorischen Drüsen vorkommt und somit ein echtes Produkt der Schleimhaut darstellt. Dagegen wird der zweite BSI auch in vivo aus dem ITI in der Schleimhaut durch limitierte Proteolyse in einen Inhibitor des Kunitz-Typs mit deutlich geringerem Molekulargewicht umgewandelt. Der entstandene niedermolekulare BSI wird wahrscheinlich passiv ins Nasensekret sezerniert.

C Ergebnisse

2 Tiere kamen nach dreistündiger Inhalation von hochaktiver 10%iger Papainlösung ad exitum.

Die Lungen waren makroskopisch von linsengroßen Blutungen übersät.
Mikroskopisch sind die Alveolen gefüllt mit Erythrozyten und Exsudat.

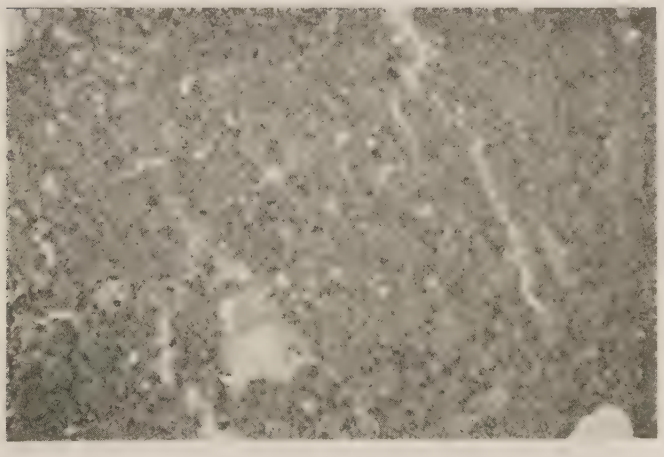


Bild 1. Kaninchenlunge nach 3 Stunden Papain-Einwirkung.

Bei den weiteren Versuchen wurden die Konzentrationen deutlich niedriger gewählt, wie in Teil E ersichtlich ist: 1,2%ige Papain-Lösung.

Nach Inhalation von inaktiviertem Papain und inaktivierten Leukozytenproteasen konnten gegenüber dem unbehandelten Tier im Lungenpräparat keinerlei Veränderungen festgestellt werden.

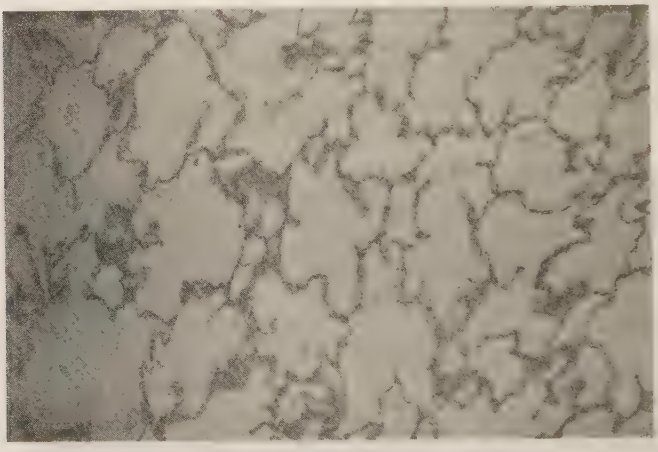


Bild 2. Kaninchenlunge nach Einwirkung inaktivierten Papains.

In der Trachea des unbehandelten Tieres waren erwartungsgemäß keine pathologischen Befunde zu beobachten

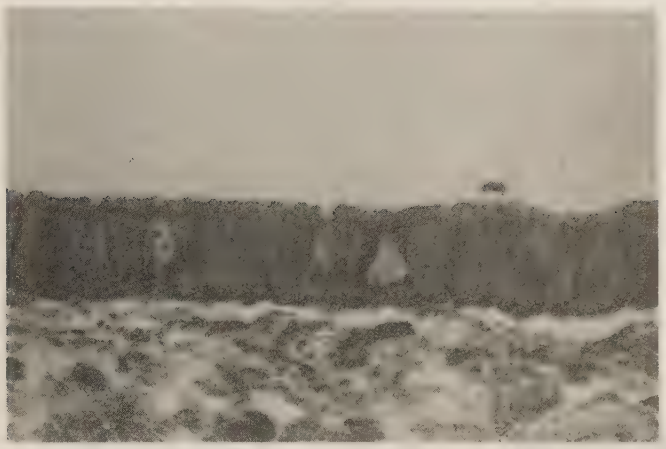


Bild 3. Kaninchentrachea eines unbehandelten Tieres.

Bei den mit inaktivierten Proteasen behandelten Tieren blieb der Trachealbereich lichtmikroskopisch unversehrt. Die Becherzellen sind weitgehend gefüllt.

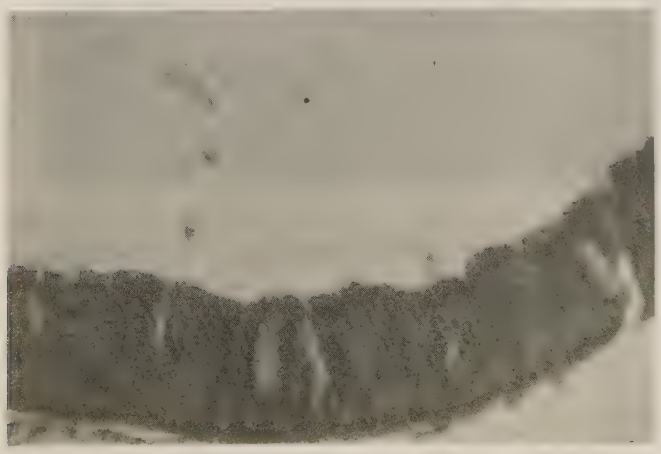


Bild 4. Kaninchentrachea nach Beatmung mit inaktivierten Proteasen.

Nach ein- beziehungsweise dreistündiger Inhalation von aktivem Papain beziehungsweise aktiven Leukozytenproteasen wurden die histologischen Präparate sowohl in der HE-Färbung als auch in der Azan- und Sudan-Färbung nach zu erwartenden Destruktionen der kollagenen und elastischen Gewebsanteile durchsucht.
In dieser Hinsicht konnten gegenüber den Präparaten des unbehandelten Tieres keine Unterschiede festgestellt werden.
Als Reaktion auf die aktiven Proteasen fanden wir jedoch eine Sekretionssteigerung der Trachealschleimhaut.
In den Präparaten der einstündig beatmeten Tiere sind teilweise die Becherzellen total entleert oder das Sekret wird gerade in das Tracheallumen abgegeben.

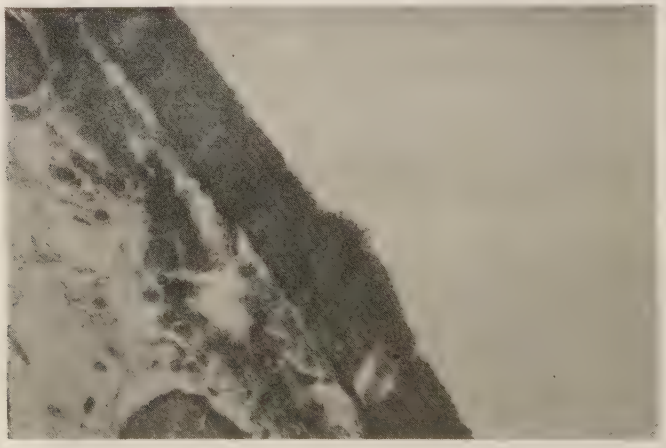


Bild 5. Kaninchentrachea nach 1 Stunde Leukozytenproteasen-Einwirkung: beginnende Becherzellen-Entleerung.

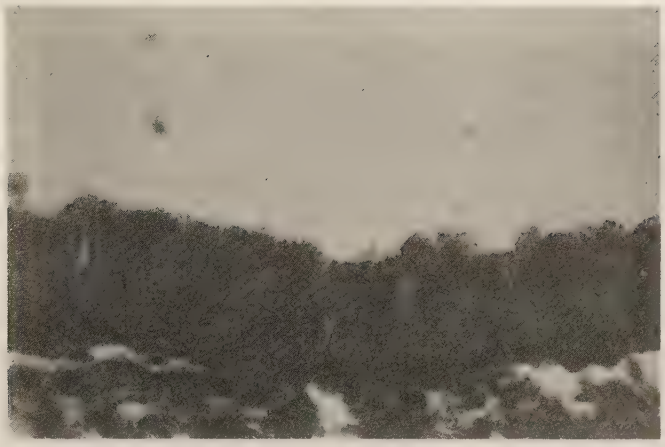


Bild 6. Kaninchentrachea nach 1 Stunde Papain-Einwirkung: beginnende Becherzellen-Entleerung.

In den Präparaten der dreistündig mit aktiven Leukozytenproteasen beziehungsweise mit Papain beatmeten Tieren fehlen die Becherzellen der Trachealschleimhaut optisch fast ganz. Nur vereinzelte Exemplare sind zu finden.
Die Cilien sind häufig verklebt. Zwischen Trachea distal und Trachea proximal besteht kein Unterschied. In den Präparaten des übrigen Respirationstraktes konnte diese Beobachtung der Becherzellen-Entleerung nicht gemacht werden.

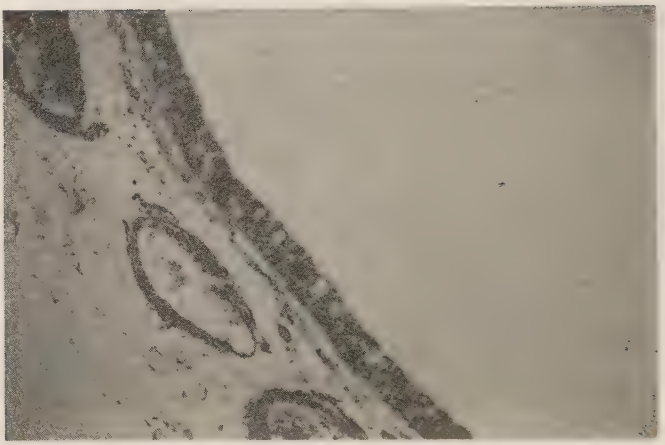
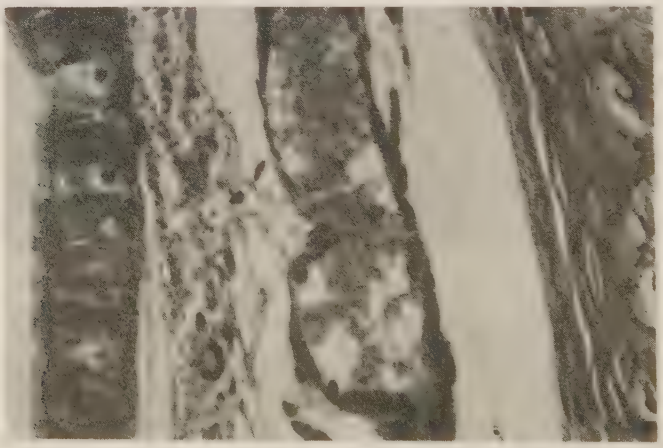


Bild 7. Kaninchentrachea nach 3 Stunden Leukozytenproteasen --Einwirkung: abgeschlossene Becherzellen-Entleerung

Bild 8. Kaninchentrachea nach 3 Stunden Papain-Einwirkung: abgeschlossene Becherzellen-Entleerung.



D Diskussion

Nachdem von Laurell und Eriksson 1969 (28) der Zusammenhang zwischen hereditärem alpha$_1$-Antitrypsinmangel und dem Entstehen eines obstruktivem Lungenemphysems beschrieben wurde, richteten sich alle Erklärungsversuche auf das Fehlen dieses Inhibitors. Bei der Phagozytose freigesetzte leukozytäre Proteasen führen zum Abbau beziehungsweise zur Einschmelzung der pulmonalen Alveolarsepten. Bei Patienten ohne alpha$_1$-Antitrypsinmangel konnten dagegen Komplexe aus alpha$_1$-Antitrypsin und Proteasen nachgewiesen werden.
Gänzlich andere Inhibitorverhältnisse liegen jedoch in den distaleren Teilen des Respirationstrakts vor. Die beiden BSI, die etwa 70 - 80% der antiproteolytischen Kapazität stellen, scheinen ein relativ sicherer Schutz gegen die Zerstörungen durch die Leukozytenproteasen zu sein. Zumindest stellt eitriges Sputum aus dem Lungengewebe, das das Flimmerepithel nach oben transportiert, für die Trachaea keine Noxe dar. Leukozytäre Schäden können jedoch auftreten, wenn das Inhibitorsystem des Respirationstrakts durch eine Superinfektion erschöpft ist. Möglicherweise ist auch die Bildungskapazität oder die Sekretionsrate während putrider Bronchitiden erniedrigt.
Meiner Meinung nach muß jedoch eine Versuchsanordnung, wie sie in unseren Experimenten mit den Kaninchen zur Anwendung kam, im Lungengewebe drastischere Veränderungen zeigen als im Trachealbereich. Die Versuchstiere mußten ein Aerosol einatmen, das mit Leukozytenproteasen beziehungsweise Papain versetzt war. Um zu deutlichen histologischen Befunden im Trachealtrakt zu kommen, wäre erst das inhibierende System zu erschöpfen.
Mit den in unseren Versuchen gewählten Konzentrationen an Leukozytenproteasen ist das BSI-System offenbar noch nicht zu überwältigen.
Die Vielzahl sich öffnender oder schon geleerter Becherzellen könnte wohl eine humorale Reaktion auf die Salzlösung sein, in der die Leukozytenproteasen gelöst waren. Es ist möglich, daß die Trachealschleimhaut auf die sich kumulierende Salzkonzen-

tration mit massiver Schleim- und Flüssigkeitsproduktion eine Verdünnung oder Neutralisation der Salzlösung zu erreichen sucht. Denkbar wäre auch eine gesteigerte Schleimproduktion zum Zweck der Eindickung, um das experimentell applizierte, leicht flüssige Aerosol in eine der Transportfähigkeit des Flimmerepithels adäquate schleimige Konsistenz umzuformen.
Zu diskutieren wäre auch die Becherzelle als Bildungsort des BSI, der jedoch von Hochstraßer und Ohlsson in den seromukösen Drüsen der tunica propria, als auch in den hochprismatischen Zellen des Flimmerepithels durch fluoreszierende Antikörper gegen den BSI nachgewiesen wurde.
Die Stimulation der Becherzellenentleerung während der Proteaseneinwirkung stellt jedoch möglicherweise eine Bestätigung bisher vorliegender Berichte dar. Dabei könnte die Sekretion des BSI mit der Entleerung des Becherzellenschleims in quantitativem Zusammenhang stehen. Schon nach 60 Minuten beginnt die Sekretion der Becherzellen. Deshalb läßt die Geschwindigkeit, mit der die Trachealschleimhaut auf den proteolytischen Reiz reagiert, an einen Sekretionsmechanismus denken. Man könnte sich den Mechanismus so vorstellen, daß die PMN-Proteasen durch Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems eine Freisetzung von Histamin bedingen. Das freigesetzte Histamin steuert dann die Becherzellenentleerung durch Erhöhung des Sekretionsgradienten im Sinne einer neurohumoralen Transmittersubstanz.
Denkbar wäre auch eine Permeabilitätssteigerung durch die Freisetzung von Histamin, die die schweren Lungenparenchymblutungen erklären könnte.
Eine echte Proteolyse der Alveolarwände, wie sie beim chronisch obstruktiven Lungenemphysem zu beobachten ist, konnte nach kurzer Einwirkungszeit experimentell nicht erzeugt werden.

E Experimenteller Teil

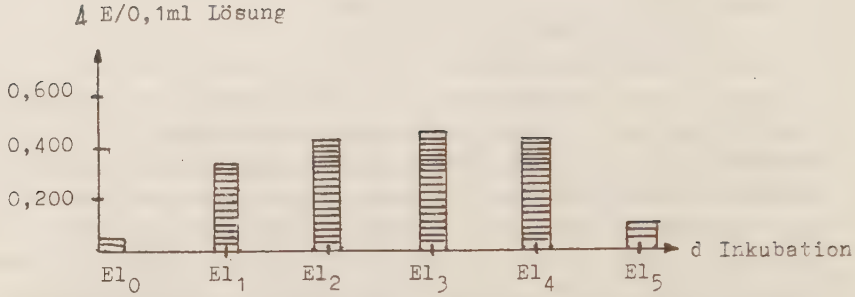
I. Gewinnung der Leukozytenproteasen

1. Gewinnung der Leukozyten

Citratblut wird bei 4000 min^{-1} circa 15 Minuten lang zentrifugiert und somit Plasma von Blutzellen getrennt.
Die der Erythrozyten-Säule aufliegende helle Schicht weißer Blutzellen wird mit einer Pipette abgesaugt. Hierbei sollte man die Pipette möglichst vorsichtig handhaben, um Hämoglobinverunreinigungen der Leukozyten gering zu halten.
Die Leukozytenfraktion wäscht man dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung, um das Serum samt den Seruminhibitoren zu eliminieren. Schließlich versetzt man zwecks Zytolyse in hypotonem Medium mit H_2O.

2. Proteasenkonzentrierung

Zum weiteren Aufschluß der Zellen wird das Zellgemisch noch etwa 20 Minuten homogenisiert. Nun incubiert man die Zelltrümmeraufschwemmung 24 Stunden bei circa 4°C, zentrifugiert bei 8000 min^{-1} 20 Minuten lang, decantiert, versetzt die Zellen abermals mit H_2O und incubiert 24 Stunden lang bei 4°C.
Diese Waschungen mit anschließender Incubation werden so oft wiederholt, bis die proteolytische Aktivität des Eluats unter ein willkürliches Minimum abfällt. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich erst in den zweiten und dritten Eluaten das Aktivitätsmaximum einstellt.



Extinktionswerte der Eluate bei 405nm:

El_0 = 0,035
El_1 = 0,335
El_2 = 0,414
El_3 = 0,464
El_4 = 0,411
El_5 = 0,087

Bild 9. Graphische Darstellung und Tabelle: proteolytische Aktivität der einzelnen Eluate aus der Leukozyten--Zelltrümmer-Aufschwemmung.

Die Waschwasser werden nun bei circa 18 000min^{-1} 20 Minuten lang zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird zur Auftrennung nach dem Molekulargewicht durch Sephadex G 100 fraktioniert (Säule 100cm, 5cm Ø, 0,05m Borat-Puffer mit p_H 7,8 enthaltend 0,1m NaCl, 200mg Trockensubstanz in 40ml Puffer). Hierbei werden Letzte Hämoglobinverunreinigungen abgetrennt.
Anschließend werden die Fraktionen erneut auf proteolytische Aktivität getestet. Alle Fraktionen mit einer Aktivierung größer als 0,2 ΔE werden vereinigt und zur Eliminierung von Salzen und niedermolekularen Anteilen 24 Stunden dialysiert und abschließend lysophilisiert bei einem Vakuum von kleiner als 0,1 Torr.

II. Die Inaktivierung der Leukozytenproteasen

Sie gelingt einfach durch zwei Stunden Inkubation einer Lyophilisatlösung in Triaethanolamin-Hydrochlorid-Puffer von p_H 7,8 bei 60°C.

III. Papain

1. Proteolytische Aktivität im p_H-Bereich von 7,8

Papain ist eine im Milchsaft der Frucht von Carica papaya (Passifloraceae = Melonenbaum in Mexiko) vorkommende Protease hoher Unspezifität. Beim p_H-Wert von 7,8, der in allen Tierversuchen eingehalten wurde, zeigt Papain höchste proteolytische Aktivität. Wir verwendeten ein Präparat der Firma Merck in Darmstadt.

2. Die Inaktivierung von Papain

Die Inaktivierung war uns mit einfacher Hitzeinkubation im Bereich von p_H 7,8 nicht möglich. Stattdessen gelang es durch Reduktion und Carboxy-methylierung die proteolytische Aktivität bis in den Bereich tolerabler Meßfehler zu senken. Da durch die Dialyse alle kurzkettigen Anteile des inaktivierten beziehungsweise seiner S-S-Brücken entledigten Papain-Moleküls eliminiert werden, wählten wir die Konzentration des inaktivierten Papains eine Zehnerpotenz kleiner als die des aktiven Papains.

IV. Die Proteasen im Tierversuch

1. Konzentration

Die proteolytische Aktivität der gewonnenen Enzyme wird nach der Azocasein-Methode bestimmt, wobei das unspezifische Enzym-Substrat Azocasein zur Verwendung kommt.

Ansatz: 0,2 ml proteasenhaltige Lösung und 0,3 ml o,2 m Triaethanolamin-Hydrochlorid-Puffer p_H 7,8 (TRA- Puffer) und 1 ml 2%ige Azocasein-Lösung in obigem TRA- Puffer.
Nach 60 Minuten Incubation bei 37°C wird sämtliches Eiweiß mit 1,5 ml 5%iger Trichloressigsäure gefällt, zentrifugiert, abdecantiert und die Extinktion bei 405 nm Filter gegen einen Leerwert gemessen, der bei identischem Ansatz ohne Incubation sofort gefällt wurde.

Für Papain ergaben sich folgende Extinktionswerte:

Papain	ΔE nach 1 Stunde Incubation	ΔE nach 2 Stunden Incubation
0,01mg	0,082	0,109
0,02mg	0,110	0,234
0,03mg	0,349	0,356
0,04mg	0,485	0,496
0,05mg	0,930	1,285
0,06mg	1,139	1,394
0,07mg	1,125	1,447
0,08mg	1,240	1,416
0,10mg	1,655	1,795

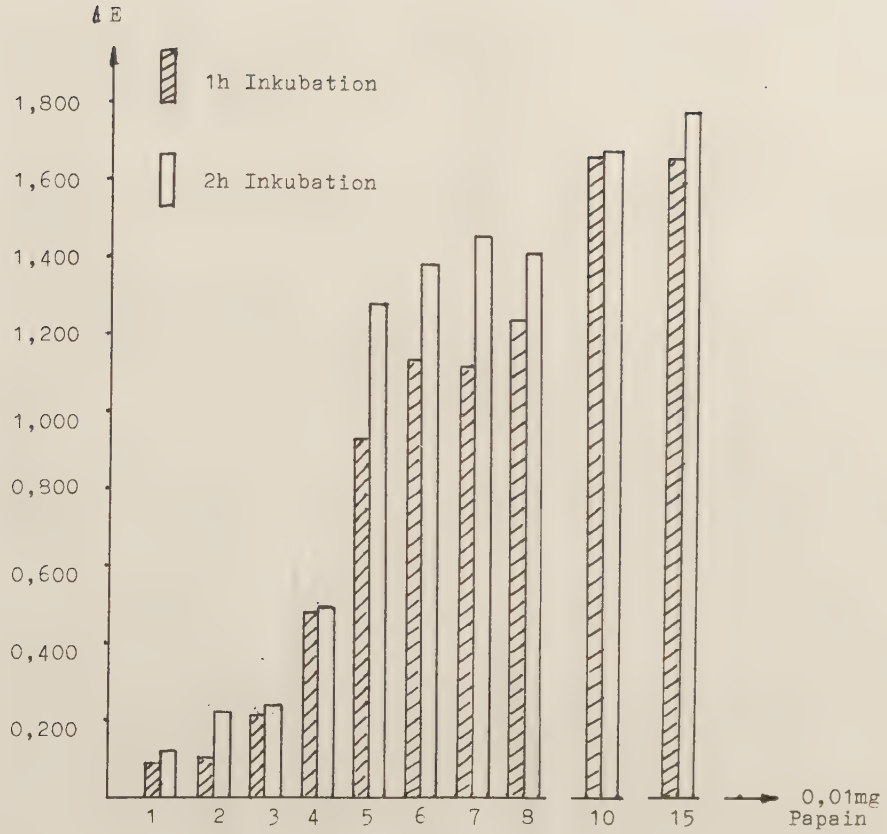


Bild 10. Graphische Darstellung der proteolytischen Aktivität von Papain gegenüber Azocasein.

Für Leukozytenproteasen ergaben sich folgende Extinktionswerte:

Leukozyten-proteasen	ΔE nach 1h Inkubation	ΔE nach 2h Inkubation
0,2mg	0,224	0,394
0,4mg	0,394	0,665
0,6mg	0,475	0,923
0,8mg	0,380	1,035
1,0mg	0,495	1,080

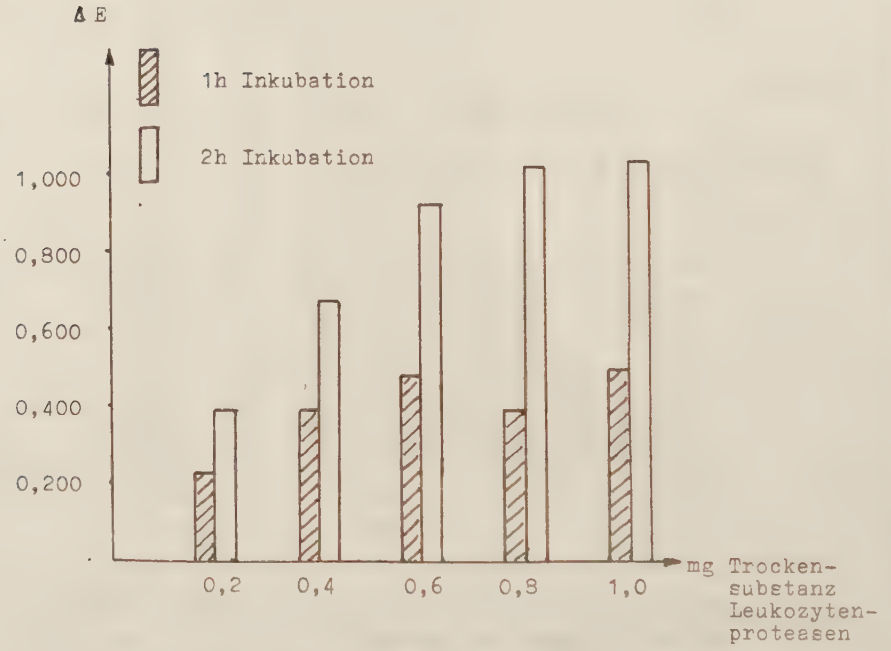


Bild 11. Graphische Darstellung der proteolytischen Aktivität von Leukozytenproteasen gegenüber Azocasein.

Aus den Werten

1mg Leukozytenprotease entspricht 4 E circa 0,500
0,04mg Papain entspricht 4 E circa 0,500
ergibt sich ein Verhältnis von

Leukozytenproteasen-Aktivität	zu	Papain-Aktivität
1	:	25

Daraufhin wurden für die Tierversuche folgende Konzentrationen gewählt:

Lyophilisat der Leukozytenproteasen	aktiv	30mg/ml	TRA-Puffer p_H 7,8
	inaktiv	30mg/ml	TRA-Puffer p_H 7,8
Papain	aktiv	1,20mg/ml	TRA-Puffer p_H 7,8
	inaktiv	0,12mg/ml	TRA-Puffer p_H 7,8

Es wurden jeweils nur 10 ml Lösung, die für eine Stunde Beatmung ausreichen, hergestellt, um Aktivitätsverluste durch Autodigestion zu vermeiden.

2. Die Applikation der Proteasen

Die Proteasen wurden in einfacher Weise so appliziert, daß die Versuchstiere ein Aerosol der in TRA-Puffer p_H 7,8 gelösten Substanzen über eine beziehungsweise drei Stunden einzuatmen hatten. Als Versuchstiere dienten Kaninchen. Es wurden jeweils zwei Tiere gleichzeitig der proteolytischen Wirkung des Aerosols ausgesetzt.
Um mögliche Fremdkörperreaktionen histologisch besser von den proteolytischen Wirkungen unterscheiden zu können, wurden zwei Tiere mit inaktivierten Proteasenlösungen im TRA-Puffer p_H 7,8 analog behandelt.

Die mit 1 bis 21 durchnummerierten Tiere wurden mit folgenden Substanzen in der jeweils angegebenen Versuchsdauer beatmet:

1 /74	und 2 /74	3 Stunden	Papain	aktiv	10%ige Lösung
3 /74	und 4 /74	1 Stunde	Papain	aktiv	10%ige Lösung.
5 /74	und 6 /74	3 Stunden	Papain	inaktiv	0,12mg/ml
7 /74	und 8 /74	1 Stunde	Papain	inaktiv	0,12mg/ml
9/ 74	und 10/ 74	3 Stunden	Papain	aktiv	1,20mg/ml
11 /74	und 12/ 74	1 Stunde	Papain	aktiv	1,20mg/ml
13 /74		unbehandelt			

14 /74	und 15/ 74	3 Stunden	Leukozytenproteasen	aktiv	30mg/ml
16 /74	und 17/ 74	1 Stunde	Leukozytenproteasen	aktiv	30mg/ml
18/ 74	und 19/ 74	3 Stunden	Leukozytenproteasen	inaktiv	30mg/ml
20 /74	und 21/ 74	1 Stunde	Leukozytenproteasen	inaktiv	30mg/ml

V. Herstellung der Präparate

Unmittelbar nach der Beatmung wurden die Versuchstiere durch Injektion von 15 ml Chloralhydrat getötet.
Nach Entblutung des Tieres wurden Gewebsproben von

Lunge,
Trachea proximal,
Trachea distal,
Nasenseptum,
Nasenmuschel

herauspräpariert und in 5%igem Formalin fixiert.

Die Herstellung der mikroskopischen Präparate erfolgte lege artis. Es wurden drei Färbungen hergestellt: HE, Azan und Sudan.

F Zusammenfassung

1. Aus Citratblut wurden Leukozyten isoliert.
2. Aus diesen Leukozyten wurden Proteasen gewonnen und deren Aktivität bestimmt.
3. Wirkungsgleiche Mengen der pflanzlichen Protease Papain und der Leukozytenproteasen wurden festgelegt.
4. Für den Kontrollversuch wurde etwa die Hälfte der Leukozytenproteasen und des Papains inaktiviert.
5. Die Versuchstiere atmeten wirkungsgleiche Mengen eines Aerosols aktiver beziehungsweise inaktiver Proteasen ein.
6. Die Lungen der Versuchstiere wiesen Haemorrhagien auf, insbesondere bei Beatmung mit Papain.
7. Der Trachealbereich der Tiere blieb weitgehend unversehrt. Mikroskopisch war eine forcierte Becherzellen-Entleerung und Schleimproduktion zu beobachten.
8. Die Kontrollgruppe der Versuchstiere mit inaktivierten Proteasen wies in der Lunge keinerlei Veränderungen auf, und im Trachealtrakt war nur eine geringe Steigerung der Schleimproduktion zu erkennen.

G Literaturverzeichnis

1) Baggiolini Marco, Bretz Ursula, Dewald B.: Biochemical and structural properties of the vacular apparatur of polymorphonuclear Leukocytes. Research Institute Wander, Bern

2) Baggiolini M., Bretz U., Gueus B.: Biochemical characterization of azurophil and specific Granules from human and rabbit polymorphonuclear Leukocytes. Schweizer med. Wschr. 104, 129-132, Bern 1974

3) Baggiolini M., Hirsch James G., De Duve Christian: Further biochemical and morphological studies of granule fractions from rabbit heterophil Leukocytes. The Journal of Cell Biology, Vol. 45,1970

4) Baggiolini M., Bretz U., Dewald B.: Subcellular localization of Granulocyte Enzymes. Research Institute Wander, Bern

5) Blondin Joanne, Janoff Aaron: The role of lysosomal Elastase in the digestion of Escherichia coli proteins by human polymorphonuclear Leukocytes. The Journal of Clinical Investigation, Vol. 58, 971-979, New York 1976

6) Cochrane C.G., Aiken B.S.: Polymorphonuclear Leukocytes in reaction immunologic: The destruction of vascular Basement Membrane in vivo and in vivo. J.Exp.Med. 124, 1966

7) Dewald B., Rindler-Ludwig R., Bretz U., Baggiolini: Subcellular localization and heterogenity of neutral Proteases in neutrophilic polymorphonuclear Leukocytes. Journal of Exp. Med., Vol.141, 1975

8) Gerber Ch.Andreas, Carson John H., Hadorn Beat: Partial purification and characterization of a Chymotrypsin-like Enzym from human neutrophil Leucocytes. Biochemica et Biophysica Acta, 364, 103-112, Amsterdam 1974

9) Grayzel Arthur I., Hatcher Victor B., Lazarus Gerald S.: Protease activity of normal and PHA-stimulated human Lymphocytes. Cellular Immunology 18, 210-219, 1975

10) Grob David: Proteolytic Enzymes.I.The control of their activity. J.Gen.Physiol.33, 103, 1946

11) Grob David: Proteolytic Enzymes. III. Further studies on Protein, Polypeptide, and other Inhibitors of Serum Proteinase, Leucoproteinase, Trypsin, and Papain. J.Gen.Physiol. 103, Baltimore 1949

12) Hamperl H., Hrg. Eder M., Gedigk P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. 29.Auflage, 1974

13) Hochgesand K., Hochstraßer K.: Nachweis von Komplexen zwischen Antitrypsin und Proteasen bei Erkrankungen im HNO-Bereich. Sonderdruck aus Archiv klin.exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk., Band 205, Heft 2, 1973

14) Hochstraßer Karl, Reichert R., Schwarz Sibylle, Werle Eugen: Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. Bd.353, S.221-226, Febr. 1972

15) Hochstraßer Karl, Haendele Hans, Reichert R., Werle Eugen: Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteaseninhibitors in menschlichem Nasensekret. Hoppe-Seyler's Z.Physiolog.Chemie,Bd.352, S.954-958, Juli 1971

16) Hochstraßer Karl, Reichert R., Schwarz Sybille, Werle Eugen: Detection and isolation of a second acid stable Proteinase Inhibitor from human bronchial Mucus. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., Bd.354, S.923-926, August 1973

17) Ignarro J.Louis: Regulation of lysosomal Enzyme Secretion: Role in Inflammation. Agents and Actions, vol.4/4 1974

18) Ignarro J.Louis: Nonphagocytic release of neutral Protease and beta-Glucuronidase from human Neutrophils. Regulation by autonomic Neurohormones and cyclic Nucleotides. Arthritis and Rheumatism, Vol.17, Nr.1, Jan.-Febr. 1974

19) Ignarro J.Louis: Neutral Protease release from human Leukocytes regulated by Neurohormones andcyclic Nucleotides. Nature New Biology, Vol.245, Okt.1973

20) Ignarro J.Louis, William George: Hormonal control of lysosomal Enzyme release from human Neutrophils: elevation of cyclic Nucleotide Levels by autonomic Neurohormones. Proc.Nat.Acad.Sci., Vol.71, No.5,1974

21) Janoff Aaron: At least three human neutrophil lysosomal Proteases are capable of degrading joint connective Tissues. Ann.N.Y.Acad.Sci.256, 1975

22) Janoff Aaron: Mediators of Tissue Damage in Leukocyte Lysosomes. X.Further studies on human Granulocyte Elastase. Laboratory Investigation, Vol.22,No.3, S.228, 1970

23) Janoff Aaron, Scherer J.: Mediators of Inflammation in Leukocyte Lysosomes. IX.Elastinolytic activity in Granules of human polymorphonuclear Leukocytes. Department of Pathology, New York 1968

24) Janoff Aaron: Neutrophil Proteases in Inflammation. Annual Review of medicine, Vol.23, 1972

25) Janoff Aaron, Blondin Joanne: The role of Elastase in the digestion of Escherichia coli Proteins by human polymorphonuclear Leukocytes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 145, S.1427-1430, 1974

26) Janoff Aaron, Blondin Joanne: The effect of human Granulocyte Elastase on bacterial suspensions. Laboratory Investigation, Vol.29, No.4, S.454, 1973

27) Janoff Aaron, Zeligs Joseph.D.: Vascular Injury and Lysis of Basement Membrane in vitro by Neutral Protease of human Leukocytes. Science, Vol.161, April 1968

28) Laurell C.B., Eriksson S.: The electrophoretic alpha$_1$-Globulin Pattern of Serum in alpha$_1$-Antitrypsin Deficiency. Scand.J.Lab.Invest. 15, 1969

29) Lieberman Jack, Gawad Mohamed A.: Inhibitors and activators of leukocytic Proteases in purulent Sputum. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Vol.77, No.5., S.713-727, 1971

30) Mounter L.A., Atiyeh Wasfi: Blood 15, 52, Richmond 1960

31) Movat H.Z., Steinberg S.G., Habal F.M., Ranadive N.S.: Kinin-forming and kinin-inactivating Enzymes in human neutrophil Leukocytes. Agents and actions, vol.3/5, 1973

32) Movat Henry Z., Steinberg Steven S., Habal Flavio M., Ranadive N.S.: Demonstration of a kinin-generating Enzyme in the Lysosomes of human polymorphonuclear Leukocytes. Laboratory Investigation, Vol.29, No.6, S. 669, 1973

33) Murphy Gillian, Reynolds John J., Bretz Ursula, Baggiolini Marco: Collagenase is a component of the specific Granules of human neutrophil Leukocytes. Biochem.J.162, S.195-197, 1977

34) Naumann H.H.: Die Abwehrprinzipien der respiratorischen Schleimhaut gegenüber Infektionen. HNO 26, 397-405, 1978

35) Ohlsson Kjell, Tegner H.: Inhibition of Elastase from Granulocytes by the low molecular weight Bronchial Protease Inhibitor. Scand.J.clin.Lab.Invest.Vol.36, 1976

36) Ohlsson Kjell, Tegner Hans: Granulocyte Collagenase, Elastase and Plasma Protease Inhibitors in purulent Sputum. Europ.J.clin.Invest. 5, S.221-227, 1975

37) Ohlsson Kjell, Olsson I.: Neutral Proteases of human Granulocytes. III. Interaction between human Granulocyte Elastase and Plasma Protease Inhibitors. Scand.J.clin.Lab.Invest., Vol.34, 1974

38) Ohlsson Kjell, Olsson Inge: Neutral Proteases of human Granulocytes. IV. Interaction between human granulocyte Collagenase and Plasma Protease Inhibitors. J.Lab.Clin.Med. Febr.1977

39) Ohlsson Kjell, Olsson Inge: The neutral Proteases of human Granulocytes. Isolation and partial characterization of Two Granulocyte Collagenases. Eur.J.Biochem. 36, S.473-481, 1973

40) Ohlsson Kjell, Olsson Inge: The neutral Proteases of human Granulocytes. Isolation and partial characterization of Granulocyte Elastases. Eur.J.Biochem. 42, S.519-527, 1974

41) Oronsky Arnold L., Perper R., Schroder Henry C: Phagocytic release and activation of human Leucocyte Procollagenase. Nature Vol. 246, Dez. 1973

42) Oronsky Arnold L., Ignarro L., Perper R.: Release of Cartilage Mucopolysaccharide-Degrading neutral Protease from human Leukocytes. The Journal of Experimental Medicine, Vol. 138, 1973

43) Rasche B., Hochstraßer K., Ulmer W.T.: Inter-alpha-Trypsininhibitor im Serum und Sekretinhibitoren im Bronchialschleim bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen. Respiration 36, S.39-47, 1978

44) Reichert R., Hochstraßer Karl, Elgas W.: Der Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors in Schleimhäuten der Atemwege. Mschr. Ohr.hk. Wien 107, S.331-334, 1973

45) Reichert R., Hochstraßer Karl, Hochgesand K.: Proteolyse und obstruktives Lungenemphysem. Münch.med. Wschr. 116, Nr. 4, 1974

46) Reichert R., Hochstraßer K.: Biochemie und Physiologie von Proteaseninhibitoren im Bereich des Respirationstrakts. Sonderdruck aus Archiv klin.exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk., Bd.202, Heft 2, 1972

47) Rindler R., Schmalzl F., Braunsteiner H.: Isolierung und Charakterisierung der chymotrypsinähnlichen Protease aus neutrophilen Granulozyten des Menschen. Schweiz. med. Wschr. 104, S.132-133, 1974

48) Rindler-Ludwig R., Braunsteiner H.: Cationic Proteins from human neutrophil Granulocytes evidence for their Chymotrypsin-like Properties. Innsbruck 1974

49) Senior Robert M., Tegner Hans, Kuhn Charles, Ohlsson Kjell, Starcher Barry C., Pierce John A.: The induction of Pulmonary Emphysema with human Leukocyte Elastase. American Review of Respiratory Disease, Vol. 116, 1977

50) Tegner Hans, Ohlsson Kjell, Olsson Inge: The Interactions between a low molecular weight Protease Inhibitor of bronchial Mucus and Chymotrypsin-like Cationic Proteins of Granulocytes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., Bd. 358, S. 431-433, 1977

51) Tegner Hans, Ohlsson Kjell: Localization of a low molecular weight Protease Inhibitor to Tracheal and Maxillary Sinus Mucosa. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., Bd.353, S. 425-429, 1977

52) Weissmann, Dingle: Release of lysosomal Protease by Ultraviolet Irradation and Inhibition by Hydrocortison. Exp.Cell Res.,25, S.207, 1961

53) Wright Daniel G., Malawista Stephen: Mobilzation and extracellular release of Granular Enzymes from human Leukocytes during Phagocytosis: Inhibition by Colchicine and Cortisol but not by Salicylate. Arthritis and Rheumatism, Vol.16, No.6, Nov.-Dez. 1973

54) Lazarus Gerald S., Brown Robert S., Daniels John R., Fullmer Harold M.: Human Granulocyte Collagenase. Science, Vol.159, 1968

Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann danke ich für die guten Arbeitsbedingungen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse an der Arbeit und seine dauernde Bereitschaft, Verbesserungsvorschläge und Anregungen zu geben.
Herrn Dr. Hochgesand danke ich für die Aufnahmen der histologischen Präparate.
Selbstverständlich möchte ich auch in meinen Dank einschließen Frau Heindl und Fräulein Lempart für die vielfältigen Hilfen im Labor.

Lebenslauf

1. Persönliche Daten

   Walter Baueregger, E.Schikaneder Str. 11, 8374 Viechtach

   Geboren am 15.10.1947 in Traunstein

2. Schulbesuch

ab September 1954	Volksschule Inzell
ab September 1959	Chiemgau Gymnasium, Traunstein
Juli 1968	Abitur, kleines Latinum

3. Studium

08.10.68	Immatrikulation an der Ludwig Maximilian-Universität München
	Fachrichtung: Chemie, Biologie für das Lehramt an Gymnasien
11.10.71	Fachwechsel zur Zahnmedizin
März 1972	Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
September 1973	Zahnärztliche Vorprüfung
Juli 1976	Staatsexamen in Zahnmedizin

4. Beruf

Ab Oktober 1976	Grundwehrdienst als Sanitätsoffizier
Ab Januar 1978	Assistenzarzt in der Gemeinschaftspraxis Dres. Heidtkamp und Ebenbeck, Regensburg
Seit März 1979	Als Zahnarzt in eigener Praxis in Viechtach tätig.